中華農業研究 28(3):171~180 (1979)

洋菇細菌性褐菇病之防治研究[1]

廖英明 杜金池 鄭哲君[2]

摘要：利用濾紙產生抑制圈及液體稀釋法測定九種殺細菌劑之藥效，結果顯示其中之 Streptomycin 及 Oxytetracycline 對洋菇細菌性褐菇病菌(*Pseudomonas tolaasi*)具有良好的抑制效果，而對洋菇菌絲生長無影響。菇床試驗方面，將 400 ppm 之 Oxytetracycline 第一次與覆土混合使用，第二次於出菇前使用時則有 85% 之防治效果；而 Oxytetracycline 及 Streptomycin 400 ppm 使用二次時則分別有 82 及 81%之防治效果。第一次使用在出菇前一星期噴洒於菇床，經過二星期後再作第二次噴洒。噴洒後 10 天 Streptomycin 在菇體殘留量為 10 ppm 而 Oxytetracycline 在噴洒後第 8 天亦具有相同之殘留量。但上述二藥劑分別於第 12 天及第 10 天後則均無法分析。

洋菇細菌性褐菇病 (Bacterial blotch of mushroom) 目前在本省已成為洋菇重要病害之一，造成經濟上的鉅大損失[1,2]。受害菇體表皮呈現褐化及些微下陷[10,16]，溫度在 8 至 18°C 範圍下洋菇易於感染此病害[3,12]，而濕度較高時更適合此病之發生。在國外，以殺菌劑來防治此病害，所使用的藥劑有 hypochloride, hexachlorophane 及含有 bromide 及 Chlorine 之 halgon compound。這些藥劑均有不同之防治效果[6,7]。近年來發現 terramycin 以 9 mg/ft^2 之劑量噴洒於菇床防治效果良好，且對人體健康無害[15]。但 Fletcher 曾強調 terramycin 對人體及動物體之病原菌容易造成抵抗性菌株之產生[5]。在臺灣，於1975年以抗生素劑來防治該病，採用 200 ppm 之 Streptomycin 與 100 ppm 之 Oxytetracycline 於出菇前以 300 ml/m^2 之劑量噴洒於菇床，二星期後再噴洒一次有 55%之防治效果。但當時並未將其對洋菇菌絲生長抑制情形及殘留量等加以測定[1]。本研究包括了室內研究部份及菇床試驗部份，一些抑制圈及混濁度之測定均作更進一步之研究。本文也記述藥劑對菌絲生長之抑制情形及藥劑在菇床上殘留情形，期能選擇出具有良好抑制效果且對人體健康無害之藥劑，作為防治該病之參考。

材料及方法

一、細菌之培養：本試驗所使用之洋菇細菌性褐菇病菌菌株係取自中興大學植病研究所細菌研究室。這些菌株在室溫下保存於有蓋試管之無菌蒸餾水中。細菌經劃線培養於 King medium B[8,11] 中，單菌落經紫外線檢查有無產生螢光，取其螢光反應之單菌落移入 Nutrient agar 或 Nutrient broth 中，於 30°C 下培養 48 小時，供各種試驗之用。

二、抑制圈產生試驗：依照 Loo's method[9]，將培養於 Nutrient agar 之細菌加入無菌蒸餾水，作成懸浮液，並以無菌蒸餾水於 620 nm 下調整其濃度為 Absorbance 0.05，此時細菌含量約為 10^7~10^8 cells/ml，然後取 1 ml 加於 40°C 左右 King medium B 培養基中混合均勻，倒成平

1. 臺灣省農業試驗所 研究報告 第 889 號。
2. 本所植物病理系技佐、技正兼系主任、研究助理。臺灣省 臺中縣 霧峰鄉。

板 (pyrex dishes，直徑 90 mm)。取直徑爲 5 mm 經過高壓殺菌之濾紙圓盤 (paper disc) 浸漬於不同濃度之 80% Hyamine 3500, 50% Hyamine 1622, 50% Hyamine 2389, 10% Aquatamine, Kanamycin, Streptomycin, Ampicillin, Oxytetracycline Chloramphenicol 等藥液中 15 分鐘。這些藥劑均已稀釋成 1,000，800、400、200、100 及 50 ppm 之濃度。濾紙取出後，置於 King medium B 培養基平板上，於 30°C 下培養 48 小時，觀察其抑制圈產生之情形，並記錄之。

三、液體稀釋法試驗：由於固體培養基易受藥劑擴散能力及其可能與培養基產生反應之影響，若改用液稀釋法即可防止此項缺點[13]。此種抑制效果可由分光光度計 (Spectro photometer) 測定其混濁度而加以確定。細菌體 (濃度爲 $10^7 \sim 10^8$ cells/ml) 1 ml 移入 10 ml 之 Nutrient broth 中，同時將各種不同濃度之藥劑分別加入，調整其濃度爲 1,000、800、400、200、100 及 50 ppm，置於 28°C 下培養 2 天，然後於 620 nm 下測其混濁度，以檢查各種藥劑之抑制能力。爲了明瞭在加入藥劑後培養液中所殘存之細菌數目，利用連續稀釋平板法 (Serial dilution method) 計算其菌落形成單位 (colony-forming units) ，而得知在培養液中之活菌數目。

四、各種藥劑對洋菇菌絲生長之影響：以濃度 400 ppm 之各種藥劑與 PDA 培養基(40°C) 混合均勻，倒成平板，再以直徑 5 mm 之洋菇菌絲塊置於平板中央，於 25°C 下培養，經過 14 天後，量取菌絲之直徑長度，以測定各種藥劑是否影響菌絲之生長。

表 1. 供試藥劑及其處理情形

Table 1. Treatments of bactericides on bed for controlling bacterial blotch of mushroom.

處理代號 Treatment designation	藥劑 Bactericide	每次施用濃度及用液量 Concentration and diluted dosage/per application		施用次數 Number application	總計量 Total dosage (mg/m^2)
		ppm	ml/m^2		
A	Oxytetracycline	400	150	2	120
B	Oxytetracycline	200	150	3	90
C	Oxytetracycline	800	75	2	120
D	Streptomycin	400	150	2	120
E	Streptomycin	200	150	3	90
F	Oxytetracycline	200	75	2	120
	Streptomycin	200	75		
G	Oxytetracycline [a]	400	150	2	120
CK_1	Control+pathogen	—	—	—	—
CK_2	Control	—	—	—	—

a. Oxytetracycline 400 ppm 150 ml/m^2 之用藥量與覆土混合，經過一星期後再以相同劑量噴洒於菇床。

400 ppm of Oxytetracycline mixed with casing soil at the dosage of 150 ml/m^2, then spraying again on the bed one week later.

五、Streptomycin 及 Oxytetracycline 之防治效果試驗：Stoller[14] 發現，在防治洋菇細菌性褐菇病時，藥劑必須在針頭期 (pin-head stage) 之前噴洒於菇床，一旦菇體感染病菌時再施藥劑均爲無效。因此，在下種後 24 天左右必須將藥劑加入菇床。第一次施藥時間爲 1979 年 1 月 18 日，

第二次爲同年2月1日，第三次爲2月15日。罹病指數（disease index）以下列公式計算：

$$罹病指數=\frac{0\times No+1\times N_1+2\times N_2+3\times N_3+4\times N_4}{4\times N_t}\times 100$$

其中N_0=健全之洋菇個體數 N_1= 罹病面積佔洋菇體表面積之$\frac{1}{5}$以下之菇體數 N_2= 罹病面積佔$\frac{1}{5}\sim\frac{2}{5}$ 之罹病菇體數 N_3=罹病面積佔$\frac{2}{5}\sim\frac{3}{5}$ 之菇體數 N_4=之罹病面積在$\frac{3}{5}$以上之洋菇體數，N_t=各菇體數之總和。

六、抗生素劑在菇體上殘留量之測定：利用對抗生素劑具敏感性之細菌菌株 *Bacillus cereus* var. *mycoides* (I. F. O. 3015) [4] 來測定抗生素劑於菇體之殘留情形，將 Oxytetracycline 及 Streptomycin 各以 1,000 ppm 之濃度 10 ml 噴洒於栽培箱中（面積 0.135 m^2），於不同時期取 10 g 之洋菇子實體加入 10 ml 之無菌水，經過研磨，並以 millipore 過濾以去掉細菌體，將圓盤濾紙浸漬於過濾液中，取出置於混合有 *B. cereus* var. *mycoides* (I. F. O. 3015) 之培養基中，測定並記錄其抑制圈直徑。

結 果

一、各種藥劑在固體培養基中之抑制效果 以圓盤濾紙抑制圈試驗九種藥劑結果，顯示 50 % Hyamine 2389 及 Kanamycin 在 1000 ppm 高濃度下對褐菇病原細仍無殺菌效果，而 Streptomycin, Oxytetracycline 及 Chloramphenicol 則有良好之抑制效果（表2）。

表 2. 各種不同濃度藥劑對洋菇褐菇病原菌之生長抑制情形比較：

Table 2. A comparison on growth inhibition of *Pseudomonas tolaasi* among different concentrations of bactericides.

藥劑 Bactericide	抑制圈直徑 Inhibition zone (cm)					
	濃度 Concentration (ppm)					
	50	100	200	400	800	1000
80% Hyamine 3500	0	0.6	0.6	0.7	0.7	0.7
50% Hyamine 1622	0	0	0.7	0.7	0.7	0.7
50% Hyamine 2389	0	0	0	0	0	0
Ampicillin	0	0	0.6	0.6	0.6	0.6
10% Aquatamine	0	0	0.6	0.6	0.7	0.8
Streptomycin	0	1.2	1.6	1.8	2.0	2.2
Kanamycin	0	0	0	0	0	0
Oxytetracycline	0	1.2	1.6	2.2	2.2	2.4
Chloramphenicol	0	1.0	1.4	1.8	1.8	2.0

二、液體稀釋法測定各種藥劑之殺菌能力 不同濃度之藥劑與洋菇細菌性褐菇病原細菌混合培養於 Nutrient broth 中，於 28°C 經3天後測其混濁度，其中 Streptomycin 1,000 ppm 及 Oxytetracycline 800 與 1,000 ppm 均無法由 Spectrophotometer 測出其混濁度（表3及圖1）。在相同濃度下，即 800 ppm 之 Streptomycin 與 Oxytetracycline 比較抑制能力時，Oxytetracycline 優於Streptomycin（圖1）。

爲進一步瞭解各種濃度之 Oxytetracycline 對褐菇病原細菌生長抑制情形，先以連續稀釋平板法測定細菌菌落形成單位（cfu），若細菌數目低於 1×10^2 cfu/ml 時則利用 Spectrophotometer 在 620 nm 下仍無法測出其混濁度，其結果列如表 4。

表 3. 各種藥劑於 620 nm 下以混濁度比較褐菇病原細菌生長量之情形 [a]

Table 3. Turbidimetric assessment of the qualitative effect of some bactericides on the growth of *Ps. tolaasi* at 620 nm. [a]

藥 劑 Bactericide	濃 度 Concentration (ppm)					
	50	100	200	400	800	1000
80% Hyamine 3500	0.170	0.105	0.190	0.220	0.320	0.190
50% Hyamine 1622	0.175	0.195	0.100	0.085	0.090	0.090
50% Hyamine 2389	0.130	0.110	0.065	0.095	0.110	0.120
Ampicillin	0.185	0.175	0.150	0.090	0.105	0.120
10% Aquatamine	0.135	0.100	0.080	0.095	0.150	0.180
Oxytetracycline	0.075	0.035	0.010	0.001	—	—[b]
Streptomycin	0.055	0.050	0.030	0.005	0.002	—
Chloramphenicol	0.080	0.055	0.040	0.020	0.010	0.010

a. 表中數字爲於 620 nm 下所測之 Absorbance 值。The numeral indicates Absorbance value under 620 nm.

b. 「—」表示在 620 nm 無法偵測。
"—" indicates it was undetectable at 620 nm.

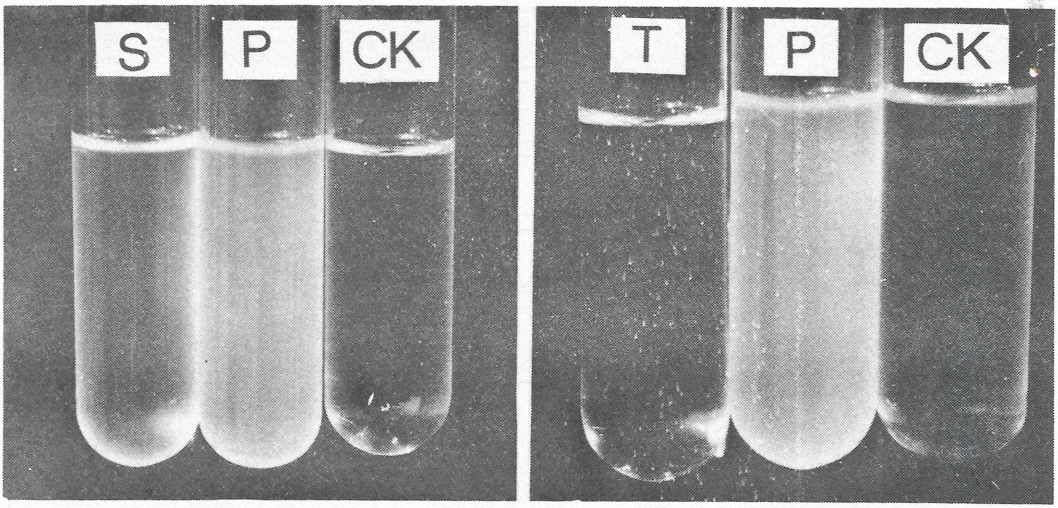

圖 1. Oxytetracycline 800 ppm 與 Streptomycin 800 ppm 之殺菌能力比較。

Fig. 1. A comparison on antibacterial activity between Oxytetracycline 800 ppm and Streptomycin 800 ppm in liguid medium.

S : Streptomycin. P : *Pseudomonas tolaasi*

T : Oxytetracycline CK : control.

三、藥劑對洋菇菌絲生長之抑制情形 洋菇菌絲在Ampicillin, Kanamycin, Streptomycin 及 Oxytetracycline 400 ppm 之濃度下生長良好，但在相同濃度下，10% Aquatamine 則於培養8天後對洋菇菌絲造成傷害：而 80% Hyamine 3500, 5% Hyamine 1622 及 50% Hyamine 2389 則阻礙菌絲生長（表5），因此，這些藥劑均不適合用於防治洋菇細菌性褐菇病。

表 4. 利用吸光度及菌落計數法比較不同濃度 Oxytetracycline 之殺菌效果 [a]

Table 4. A comparison on bacteriostatic activity of different concentrations of Oxytetracycline by the Absorbance and true counts of bacterium [a].

濃度 Concentration ppm	吸光度 Absorbance at 620 nm	菌落形成單位 Colony-forming units (cfu/ml)
50	0.075	4×10^{8}
100	0.035	6×10^{7}
200	0.010	8×10^{5}
400	0.001	4×10^{3}
800	—	1×10^{2}
1000	—	1×10^{1}
CK	0.440	7×10^{11}

a. 細菌培養於 Nutrient broth 中，但未加入 Oxytetracycline.
Bacterium incubated on nutrient broth for 3 days without adding Oxytetracycline.

表 5. 藥劑對洋菇菌絲生長之影響 [a]

Table 5. Effect of bactericides on mycelial growth [a]

藥劑 Bactericides	菌絲長度 Length of mycelium (cm)					
	天數 Days					
	2	4	6	8	10	12
80% Hyamine 3500	0.5	0.5	0.5	0.5	—	—
50% Hyamine 1622	0.5	0.5	—	—	—	—
50% Hyamine 2389	0.5	0.5	0.5	—	—	—
Ampicillin	0.7	1.2	1.8	2.2	2.8	3.0
10% Aquatamine	0.5	0.5	0.6	—	—	—
Streptomycin	0.7	1.3	1.8	2.4	3.0	3.2
Kanamycin	0.7	1.2	1.7	2.4	2.8	3.0
Oxtetracycline	0.7	1.2	1.6	2.2	2.8	3.0
CK	0.7	1.2	1.8	2.5	2.8	3.2

a. 「—」表示菌絲死亡。
"—" indicates the mycelium was dead.

四、 Oxytetracycline 及 Streptomycin 於菇床防治洋菇細菌性褐菇病試驗 本項試驗結果顯示處理間與未處理間之罹病指數有極大的不同。Oxytetracycline 400 ppm 首先與覆土混合使用

，於出菇前再使用一次（處理 G）之防治效果爲 85 %；而 Oxytetracycline 及 Streptomycin 400 ppm 使用二次（處理 A 及 D）則分別有 82 及 81 %之防治效果（圖 2）。

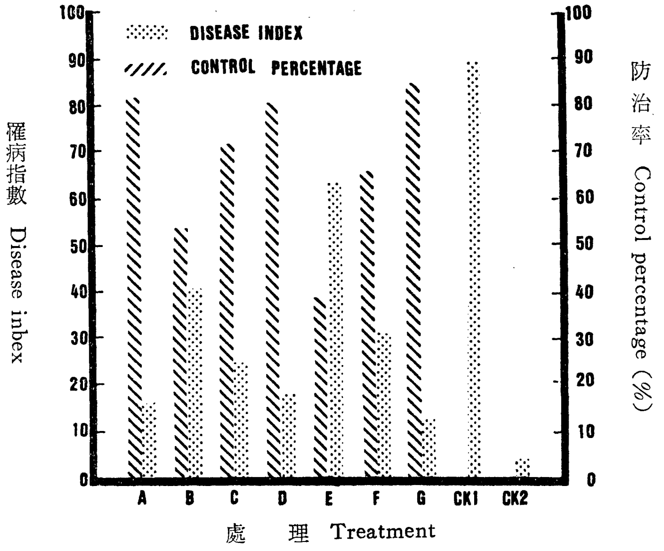

圖 2. 各種藥劑處理對洋菇細菌性褐菇病之防治效果比較（各處理參照表 1）

Fig 2. Different treatment of bactericides for control of bacterial blotch of mushroom. (detailed treatments shown in Table 1).

在產量方面，以每平方公尺之菇體總重量（g/m²）比較結果，各處理時間差別不大，亦即不同藥劑處理並不提高洋菇之產量，而是減少罹病菇數。但若加入褐菇病菌而未用藥劑處理（CK_1），則

表 6. 不同藥劑處理間產量和子實體數量之比較

Table 6. A comparison on yields and number of mushroom in a unit area among different treatments.

處理 Treatments	子實體數 Fruiting body/m²	產量[a] Yields (g/m²)
CK_2	1066	9709 a
E	1006	9043 b
B	1043	8850 b c
G	940	8715 b c d e f
A	1026	8710 c d e f g
D	1190	8680 b c d
F	910	8599 b c d e
C	903	8514 e f g
CK_1	1125	6919 h

a. 小寫部份英文字母相同者爲依 Duncan 氏多變域測驗法，在 LSD 1 % 下不顯著者。

The small letters represent Duncan's multiple range groupings of treatments that do not differ significantly at the 0.01 level,

其產量顯著地減少（表6）。藥劑處理使產生菇體數略爲減少，但處理 D 則增加，因此，施用藥劑對菇體數之產生影響不大。各處理對洋菇體數產生之影響詳列於表 6 。

五、Oxytetracycline 及 Streptomycin 在菇體之殘留情形 利用對抗生素劑具敏感性之細菌菌株測定其抑制圈產生之結果顯示抑制圈大小隨著藥劑濃度之增高而增大，Streptomycin 在濃度爲 200 ppm 時抑制效果大於濃度爲 200 ppm 之 Oxytetracycline，但在 400 ppm 以上時 Oxytetracycline 之抑制效果則優於 Streptomycin 。詳細結果列於表 7 。

無論 Streptomycin 或 Oxytetracycline ，原來之施藥量爲 1,000 ppm ，而施藥當時所能回收之劑量爲 200 ppm 。經過 10 天後 Oxytetracycline 則明顯的減弱至無法偵測，Streptomycin 在經過 12 天後則有相同的結果。施藥後經過不同日數所能回收之藥劑量，詳列如表 8 及表 9 。

表 7. Oxytetracycline 及 Streptomycin 對 *Bacillus cereus* var. *mycoides* (I. F. O. 3015) 產生抑制圈之結果。

Table 7. Inhibition of different concentrations of Streptomycin and Oxytetracycline to the growth of *Bacillus cereus* var. *mycoides* (I. F. O. 3015)

藥 劑 Bactericide	抑制圈直徑 Inhibition zone (mm)							
	濃度 Concentration (ppm)							
	0	10	50	100	200	400	800	1000
Streptomycin	0	5.5	8	10	12	14	16	17
Oxytetracycline	0	5.5	8	10	10	16	17	18

表 8. 不同時期之洋菇體所含 Streptomycin 及 Oxytetracycline 對 *Bacillus cereus* var. *mycoides* (I. F. O. 3015) 之抑制情形。

Table 8. Inhibition of streptomycin and Oxytetracycline in mushrooms at different periods aftər application to the growth of *Bacillus cereus* var. *mycoides* (I. F. O. 3015)

藥 劑 Bactericide	抑制圈直徑 Inhibition zone (mm)							
	噴洒後天數 days after spraying							
	0	2	4	6	8	10	12	14
Streptomycin	10.0	8.0	7.0	6.0	6.0	5.5	0	0
Oxytetracycline	10.0	8.0	7.0	6.0	5.5	0	0	0

表 9. Streptomycin 與 Oxytetracycline 在洋菇子實體之殘留量

Table 9. Residues of streptomycin and Oxytetracycline in fruiting body of mushroom.

藥劑 Bactericide	濃度 Concentration (ppm) 噴洒後天數 Days after spraying							
	0	2	4	6	8	10	12	14
Streptomycin	200	100	32	20	20	10	0	0
Oxytetracycline	200	100	32	20	10	0	0	0

討論

洋菇細菌性褐菇病過去用 hexachlorophene 來防治，惜此藥劑最近在英國因對嬰兒過份濫用而被禁止使用[15]。因此，必須另外尋找適當的藥劑來控制該病之蔓延。由本研究得知八種供試藥劑 80% Hyamine 3500, 50% Hyamine 2389, 50% Hyamine 1622, Ampicillin, 10% Aquatamine, Streptomycin, Kanamycin 及 Oxytetracycline 中之 Streptomycin 及 Oxytetracycline 具有良好的防治效果而且對洋菇菌絲生長無害（表2、3及5）。Stoller[15] 發現以 Terramycin 9 mg 噴洒於一平方呎之菇床表面其安全性是無可顧慮的，而本試驗所使用之濃度又低於此劑量。因此，其安全性應在許可範圍內。以 *Bacillus cereus* var. *mycoides* (I. F. O. 3015) 來測定藥劑在洋菇體上之殘留量可知 Oxytetracycline 及 Streptomycin 之殘留量極少且易於消失（表8及9），而對人體無影響。在菇床使用方面，Oxytetracycline 及 Streptomycin 具有良好之防治效果（圖2）。培養基在抑制圈試驗中被視為一重要的影響因子，因此必須以液體稀釋法及計算其活菌數目來作更進一步證明該藥劑之抑制效果。以分光光度計來測定培養液之混濁度無法測得 800 ppm Oxytetracycline之混濁度，但由 cfu 之計算得知其細菌含量為 1×10^2 cfu/ml 。在防治效果而言，各處理間有明顯的區別存在，另一值得注意的是有些藥劑對洋菇菌絲生長有所影響，因此，這些藥劑即使其在抑制圈試驗中表現出其抑制能力也不適合作為該病之防治藥劑。一般而言，在對洋菇細菌性褐菇病之防治效果比較中，其序列為 Oxytetracycline 優於 Streptomycin 。因此， Oxytetracycline 及 streptomycin 可作為防治洋菇細菌性褐菇病菌之優良藥劑。

引用文獻

1. 杜自疆・1976・抗生素對於洋菇細菌性褐菇病之防治效果。臺灣區第五屆洋菇學術討論會報告：287–297。
2. 胡開仁、杜自疆、毛鑑銘・1964・臺灣省洋菇病害調查報告（1）・ 農業研究3（4）：36–48。
3. 徐世典、陳脉紀・1974・臺灣洋菇之細菌性褐菇病。中國園藝 20(2)：71–78。
4. 盧耀村・1975・四環素及滲透性藥劑在水稻組織體內之轉移及其對病原菌質體之影響。植物病理學學報 6：74–83。
5. Fletcher, J. T. 1978. Terramycin for the control of bacterial blotch. mushroom Jour. 70 : 333.
6. Gandy, D. G. 1966. The epidemiology of Bacterial Blotch of the Cultivated mushroom. Report of the Glasshouse Crops Research Institute. 150–154.
7. Gandy, D. G. 1968. Glasshouse Crops Research Insititute Report. 99.
8. King, E. O., M. K. Ward and D. E. Raney. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. J. Las. Clin. Med. 44 : 301–307.
9. Loo, Y. H. et al. 1945. Assay of streptomycin by the paper disc plate method. Jour. Bact. 50 ;

701-709.
10. Paine, S. G. 1919. A brown blotch disease of cultivated mushrooms. Ann. Appl. Biol. 5 : 206-219.
11. Sands, D. C. and A. D. Rovira. 1970. Isolation of fluorescent Pseudomonas with a selective medium. Appl. Microbiol. 20 : 513-514.
12. Sinden, J. W. 1971. Ecological control of pathogens and weed-molds in mushroom culture. Ann. Rev. Phytopathology. 9 : 411-432.
13. Spooner, D. F. and G. Sykes. 1976. Laboratory Assessment of Antibacterial activity. Method in Microbiology. Vol. 7B : 211-232.
14. Stoller, B. B. 1968. Bacterial Blotch. MGA Bull. 224 : 398.
15. Stoller, B. B. 1978. Control of Bacterial Blotch of mushroom. mushroom Jour. 7 : 212-214.
16. Tolaas, A. G. 1915. A bacterial disease of cultivated mushroom. Phytopathology. 5 : 51-55.

Control of bacterial blotch of mushroom[1]

Ying-ming Liao, Chin-chyu Tu and Jer-jiun Jeng [2]

Nine bactericides were tested by paper disc inhibition and turbiditric assessment. The results indicated that Streptomycin and Oxytetracycline showed effective inhibition of *Pseudomonas tolaasi*, and gave no effect on mycelial growth of *Agaricus bisporus*. The test of residues of bactericides on fruiting bodies of mushroom by *Bacillus cereus* var. *mycoides* (I. F. O. 3015) shown that the Oxytetracycline and Streptomycin had no effect on human's health. The bed test showed that the control percentage for bacterial blotch was 85 % when the Oxytetracycline 400 ppm first mixed with casing soil and then spray on the surface of beds before the formation of fruiting bodies. Two sprays of Oxytetracycline 400 ppm and Streptomycin 400 ppm onto the beds gave 82 % and 81% of control, respectively. The first spray was given before pin-head formation, and the second one was at two weeks later. The residues of Streptomycin on fruiting bodies was 10 ppm in ten days after spraying, while the same dosage was detected from Oxytetracycline after eight days.

---

1. Contribution No. 889 from the Taiwan Agricultural Research Institute.

2. Junior plant pathologist, Senior plant pathologist & head and Research assistant, Department of Plant Pathology, respectively. TARI. Wufeng, Taichung, Hsien, Taiwan 431. ROC.